



TITLE:

がんにおける膜型マトリックスメ
タロプロテアーゼ1のインビボ機能
解析を目的とした核医学分子イメ
ージングプローブ開発に関する研
究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

近藤, 直哉

CITATION:

近藤, 直哉. がんにおける膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1のインビボ機能解析を目的とした核医学分子イメージングプローブ開発に関する研究. 京都大学, 2015, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18921>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は
2016/03/22に公開; 許諾条件により本文は2016-01-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（薬科学）	氏名	近藤 直哉
論文題目	がんにおける膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1のインビボ機能解析を目的とした核医学分子イメージングプローブ開発に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1（MT1-MMP）は、がん細胞膜上に発現する酵素であり、細胞外基質の分解や、細胞へのシグナル伝達を介して、がんの浸潤・転移に関与している。したがって、MT1-MMPの発現量や酵素活性のインビボ評価はがんの悪性度診断に有益な情報を提供することが期待される。一方、核医学分子イメージング法は、陽電子断層撮像法（PET）や単光子断層撮像法（SPECT）を用いて、体内に投与された放射性分子プローブと標的分子との生体内相互作用を非侵襲的かつ高感度に捉える臨床画像診断法である。そこで、これまでに、核医学分子イメージング法を対象として、MT1-MMP発現量のインビボ評価を目的とした放射性標識抗体プローブが開発されてきたが、抗体は血中からの消失が遅く投与後撮像までに長時間を要するという問題を有していた。このような背景のもと、本研究では、MT1-MMP発現量および酵素活性を対象に、投与後早期での核医学画像解析によるインビボ評価を可能とする核医学イメージングプローブの開発について計画した。</p>			
第1章 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の発現量評価を目的とした核医学イメージングプローブの開発			
<p>scFv、diabodyなどの低分子化抗体は標的への高い親和性・特異性を有し、かつ抗体と比較して素早い体内動態を示すため、低分子化抗体プローブを開発すれば投与後早期でのイメージングが可能となると期待される。そこで、MT1-MMPへ高い親和性を示す低分子化抗体をファージディスプレイ法により取得し、二官能性キレート試薬p-SCN-Bn-DTPAを介し、SPECTでの撮像に適した¹¹¹Inを導入した低分子化抗体プローブ（[¹¹¹In]scFv、[¹¹¹In]diabody）を設計・合成した。得られた低分子化抗体プローブについて、MT1-MMPを高発現するがん細胞を皮下移植したマウスを用いて、その体内動態を調べた結果、[¹¹¹In]scFv、[¹¹¹In]diabodyは投与後早期より腫瘍へ集積し、イメージングの指標となる腫瘍対血液放射能集積比は投与後早期より抗体プローブより高い値を示した。さらに両プローブを用いてSPECT撮像を行った結果、投与3時間後より腫瘍の描出が可能であり、また腫瘍内の放射能分布はMT1-MMP免疫染色によるMT1-MMP発現陽性部位と一致する傾向を示した。以上より、[¹¹¹In]scFv、[¹¹¹In]diabodyは投与後早期でのMT1-MMPの発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。</p> <p>また、ペプチドは生物活性と速やかな体内動態を両立でき、さらに、ペプチドプローブは抗体誘導体の場合と異なり標識前駆体との分離精製が容易であることから、比放射能の高い均一なプローブを得ることが可能である。そこで、MT1-MMP</p>			

の発現量評価を可能とするペプチドプローブの開発を考え、MT1-MMP結合性ペプチドに対し、安定性向上、親和性保持を考慮して、C末に標識用Cys残基を結合したD体ペプチド誘導体 (DC) を設計した。放射性核種としてはSPECTに適した ^{123}I を選択し、*N*-(*m*- ^{123}I iodophenyl) maleimideを合成後、これをペプチドのC末のCys残基側鎖チオール基と反応させることにより、標識体 (^{123}I I-DC) を低分子化抗体プローブの場合と比較して5,000倍以上高い比放射能で合成することに成功した。さらに、 ^{123}I より半減期が長く取扱いの容易な ^{125}I を用いて合成した ^{125}I I-DCを用いて、MT1-MMPタンパク質に対する結合飽和実験を行った結果、本化合物はMT1-MMPに親和性を有することが認められた。また、担がんマウスを用いて体内動態を検討した結果、 ^{125}I I-DCは投与後早期より腫瘍へ集積し、さらに ^{123}I I-DC投与30分後でのSPECT撮像により腫瘍のイメージングに成功し、また腫瘍内の放射能分布はMT1-MMP発現陽性部位と一致する傾向を示すことを認めた。以上より、 ^{123}I I-DCはMT1-MMPの発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。

第2章 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の活性評価を目的とした核医学イメージングプローブの開発

MT1-MMP依存的に活性化されて生成したものが標的に集積するように設計された活性化型プローブは、MT1-MMP 1分子に対し複数のプローブが反応できるため、結合同型プローブと比較してより効率的な標的への集積が期待できる。そこで、MT1-MMPの活性評価を目的とした活性化型プローブとして、MT1-MMP基質ペプチドに、ポリエチレングリコール (PEG) と ^{18}F 標識蛍光団 (^{18}F BODIPY) を結合させ、がん組織においてMT1-MMPによる基質ペプチドの切断によりPEGが離脱すると、その高い細胞膜透過性により ^{18}F BODIPY部が近傍がん細胞に効率的に取り込まれることを期待したプローブ (^{18}F MBP-2k) を設計、合成した。得られた ^{18}F MBP-2kは、所期の通り、MT1-MMP発現細胞に非発現細胞より高く取り込まれた。また、MT1-MMP陽性及び陰性担がんモデルマウスを用いた体内分布実験の結果、 ^{18}F MBP-2kはMT1-MMP陽性腫瘍へより高く集積し、投与2時間後でのPET撮像によりその陽性腫瘍の描出が可能であった。以上より、 ^{18}F MBP-2kはMT1-MMPの活性評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。

以上、本研究はMT1-MMPの発現量および酵素活性のインビボ解析によりがんの悪性度診断への貢献が期待される核医学イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、これらの知見は、今後のがんの病態評価、医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供すると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

がんの浸潤・転移に関与している、がん細胞膜上の膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1 (MT1-MMP) の発現量や酵素活性のインビボ評価を目的として、これまでに核医学イメージング用放射性標識抗体プローブが開発され、その有効性が評価されてきた。しかし、抗体は血中からの消失が遅く、投与後撮像までに長時間を要するという臨床実用上の問題を有していた。そこで本論文は、投与後早期にMT1-MMP発現量および酵素活性をインビボ評価できる核医学イメージングプローブの開発を計画したものである。

著者は、先ず、scFv, diabodyなどの低分子化抗体の標的への高い親和性・特異性と抗体より速い体内分布動態に着目して、ファージディスプレイ法により取得したMT1-MMP低分子化抗体に、二官能性キレート試薬*p*-SCN-Bn-DTPAを介し、SPECTでの撮像に適した¹¹¹Inを導入した低分子化抗体プローブ (¹¹¹In]scFv, [¹¹¹In]diabody) を設計・合成した。得られた低分子化抗体プローブについて、MT1-MMP発現がん細胞移植マウスでの体内動態を調べた結果、両プローブは投与後早期より腫瘍へ集積し、かつ抗体プローブより高い腫瘍対血液放射能集積比を示した。さらにSPECT撮像において、投与3時間後より腫瘍が描出でき、また腫瘍内の放射能分布はMT1-MMP免疫染色によるMT1-MMP発現陽性部位と一致する傾向を示した。以上より、¹¹¹In]scFv、¹¹¹In]diabodyは投与後早期でのMT1-MMPの発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。さらに、高い生物活性、速やかな体内動態、高い比放射能が期待できるペプチドプローブの特性に着目し、安定性向上、親和性保持を考慮して、C末に標識用Cys残基を導入した*N*-(*m*-[¹²³I]iodophenyl) maleimide 結合D体ペプチド誘導體 (¹²³I]I-DC)を設計、合成した。得られたペプチドプローブは、低分子化抗体プローブの5,000倍以上の比放射能、MT1-MMPへの親和性、担がんマウスでの体内動態で投与後早期からの腫瘍集積、投与30分後での明瞭な腫瘍SPECT像、MT1-MMP発現陽性部位と一致する腫瘍内の放射能分布を示すことを認め、本化合物が発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。

さらに、MT1-MMPの活性評価を目的としたプローブの開発を目的として、MT1-MMP基質ペプチドに、ポリエチレングリコール (PEG) と¹⁸F標識蛍光団 (¹⁸F]BODIPY) を結合させ、がん組織においてMT1-MMPによる基質ペプチドの切断によりPEGが離脱すると、その高い細胞膜透過性により¹⁸F]BODIPY部が近傍がん細胞に効率的に取り込まれることを期待した活性化型プローブ (¹⁸F]MBP-2k) を設計、合成した。得られた¹⁸F]MBP-2kは、MT1-MMP発現細胞に非発現細胞より高く取り込まれ、また、MT1-MMP担がんモデルマウスでの体内分布実験の結果、¹⁸F]MBP-2kはMT1-MMP陽性腫瘍へより高く集積し、投与2時間後でのPET撮像によりその陽性腫瘍の描出が可能であった。以上より、¹⁸F]MBP-2kはMT1-MMPの活性評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。

以上、本研究はMT1-MMPの発現量および酵素活性のインビボ解析によりがんの悪性度診断への貢献が期待される核医学イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、これらの知見は、今後のがんの病態評価、医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供するものと評価される。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年2月25日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降